

JP1268646

Publication Title:

ANTITUMOR AGENT

Abstract:

Abstract of JP1268646

PURPOSE:To provide an antitumor agent containing a specific monoclonal antibody produced by a hybridoma prepared from an antibody-producing cell of a mouse sensitized with a mouse lymphoma cell, as an active component.
CONSTITUTION:An antibody-producing cell obtained by immunizing a type-A mouse with a T-cell leukemia cell strain EL4 originated from C57BL/6 mouse is fused with a myeloma cell strain NS1 originated from a Balb/C mouse. The obtained hybridoma is screened, the screened cell capable of producing an antibody having cytotoxic activity is cloned by limiting dilution analysis and the cloning process is repeated to obtain hybridomas A1.267, A1.410 and A1.425, from which monoclonal antibodies A1.410 and A1.425 having the following properties are prepared. Immunoglobulin class, (IgG3.x); strength of the recognition specificity to cell surface ganglioside, GD2>GD3, GD1b, GD1a, GQ1b>GT1; recognition of monoclonal antibody, exclusively recognizing monoclonal antibody A1.267 and GD2. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

⑫ 公開特許公報(A) 平1-268646

⑬ Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公開 平成1年(1989)10月26日
A 61 K 39/395	ADU	N-8829-4C	
C 12 N 5/00		B-8515-4B	
		C-8412-4B	
C 12 P 21/00		D-6712-4B	
// C 07 K 15/04			
(C 12 P 21/00			
C 12 R 1:91)			
審査請求 未請求 請求項の数 3 (全21頁)			

⑮ 発明の名称 抗腫瘍剤

⑯ 特 願 昭63-95724

⑰ 出 願 昭63(1988)4月20日

特許法第30条第1項適用 昭和62年10月20日 日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会・学術集会記録第17巻」に発表

⑱ 発 明 者	多 田 伸 彦	神奈川県小田原市板橋字上ノ山793
⑱ 発 明 者	小 田 宗 宏	神奈川県伊勢原市池端252-2 樟ハイツ206
⑱ 発 明 者	黒 津 隆 宏	神奈川県小田原市浜町3-16-7
⑱ 発 明 者	池 上 秀 二	神奈川県南足柄市駒形新宿93-1 パレス東原202
⑱ 出 願 人	明治乳業株式会社	東京都中央区京橋2丁目3番6号
⑱ 代 理 人	弁理士 戸田 親 男	

明 細 書

1. 発明の名称

抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲

1. C57BL/6マウス由来のT細胞白血病細胞株EL4でA系マウスを免疫することにより得られる抗体産生細胞とBalb/c系マウス由来の骨髄腫細胞株NS1とを融合させることにより得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IgG3, x)であって、細胞表面ガングリオシドに対する認識の特異性の強さにおいて、GD2>GD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuGc, NeuAc), GD1b, GT1a, GQ1b>GT1

であるモノクローナル抗体A1.267を有効成分とする抗腫瘍剤。

2. C57BL/6マウス由来のT細胞白血病細胞株EL4でA系マウスを免疫することにより得られる抗体産生細胞とBalb/c系マウス由来の骨髄腫細胞株NS1とを融合させることにより得られるハイブ

リドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IgG3, x)であって、細胞表面ガングリオシドGD2を認識するモノクローナル抗体A1.410を有効成分とする抗腫瘍剤。

3. C57BL/6マウス由来のT細胞白血病細胞株EL4でA系マウスを免疫することにより得られる抗体産生細胞とBalb/c系マウス由来の骨髄腫細胞株NS1とを融合させることにより得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IgG3, x)であって、細胞表面ガングリオシドGD2を認識するモノクローナル抗体A1.425を有効成分とする抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なモノクローナル抗体A1.267、A1.410またはA1.425を有効成分とする抗腫瘍剤に関するものである。

更に詳しくは本発明は、C57BL/6マウス由来のT細胞白血病細胞株EL4でA系マウスを免疫することにより得られる抗体産生細胞とBalb/c系マウ

骨髓腫細胞NSIとを融合させることにより得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IgG3, κ)であって、マウス及びヒトの腫瘍細胞の細胞表面の強固共通の腫瘍関連抗原であるカングリオシドをGD2/GD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuGc, NeuAc), GD1b, GT1a, GQ1b>GT1の順に強く認識するモノクローナル抗体A1.267を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

また、本発明は、C57BL/6マウス由来のT細胞白血病細胞株EL4でA系マウスを免疫することにより得られる抗体産生細胞とBalb/c系マウス由来の骨髓腫細胞株NSIとを融合させることにより得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IgG3, κ)であって、細胞表面カングリオシドGD2を認識するモノクローナル抗体A1.410を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

更に、本発明は、C57BL/6マウス由来のT細胞白血病細胞株EL4でA系マウスを免疫することにより得られる抗体産生細胞とBalb/c系マウス由来の骨髓腫細胞株NSIとを融合させることにより

得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IgG3, κ)であって、細胞表面カングリオシドGD2を認識するモノクローナル抗体A1.425を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

なお、本発明においてカングリオシドの名前(GD2, GD3などはSvennerholmの命名法(Svennerholm, L. J. *Lipid Res.* 5, 145-155 (1964))による。また、GD3のシアル酸誘導体は括弧の中に記した。すなわち、GD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuAc, NeuGc), GD3(NeuGc, NeuAc)、およびGD3(NeuGc, NeuGc)はそれぞれ、 $\text{H}^2(\text{NeuAc})_2$ 、 $-\text{LacCer}$ 、 $\text{H}^2(\text{NeuAc} \alpha 2 \rightarrow 8\text{NeuGc})$ 、 $-\text{LacCer}$ 、 $\text{H}^2(\text{NeuGc} \alpha 2 \rightarrow 8\text{NeuAc})$ 、 $-\text{LacCer}$ 、 $\text{H}^2(\text{NeuGc})_2$ 、 $-\text{LacCer}$ を意味する。そのほかの物質の名称はIUPAC-IUB会議(IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, *Lipids* 12, 455-463(1977))による。

(従来の技術)

KoehlerとMilsteinが抗体産生細胞と腫瘍細胞との融合細胞(ハイブリドーマ)を用いてモノク

ローナル抗体の作成する方法(*Nature*, 256, 495 (1975))を確立して以来、腫瘍細胞表面に存在する腫瘍特異抗原に対するモノクローナル抗体を獲得しようとする試みがなされてきた。(Koprowski, H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 3405(1978); Herlyn, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1438(1979))これはモノクローナル抗体の抗原に対する高い特異性・厳峻性を利用して、基礎医学においては腫瘍特異抗原の解析を徹底的に発展させること、臨床分野においては癌の的確な診断や病を早い打ちにする治療への応用が期待されたからである。

当初こうした研究は腫瘍抗原の抗原決定基として腫瘍細胞蛋白質を対象として研究された。ところがこれらの抗原に対するモノクローナル抗体は正常細胞とも反応し、腫瘍細胞に対する特異性という観点からみると期待を裏切ったものであったのである。

しかしながらこのようなモノクローナル抗体の中に数は少ないながらも比較的腫瘍細胞に対する

特異性の高いものがみられた。そこでこれら特異性の高いモノクローナル抗体の認識している抗原を調べたところ、腫瘍細胞表面の糖脂質、糖蛋白質の知基複合糖質の糖鎖部分を認識していることが判明した。この中でもとりわけカングリオシド即ちシアル酸を有する糖脂質が特異性が高いことが判った。(Hakomori, S. *Cancer Res.* 45, 2405-2414(1985))。そして、カングリオシドを認識するモノクローナル抗体の中には、既にモノシアログンリオシドCA19-9を認識する1116NS19-9(Koprowski, H. et al. *Somatic Cell Genetics*, 5, 957(1979); Magnani, J. et al. *Science*, 212, 55(1981))のように癌の診断に使用されているものもある。

カングリオシドに対するモノクローナル抗体には以上のほか、GD3に対してはPukel G. S. et al. *J. Exp. Med.* 155, 1133-1147(1982)やNudelmann, E. et al. *J. Biol. Chem.* 257, 12752-12756 (1982)、GD2に対してはCahan, L. D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7629-7633

(1982). Cheresch, D. A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5767-5771(1984). Cheung, N. K. et al. Cancer Res. 45, 2642-2649.
および Saito M. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 1-7(1985). GM2 に対しては Tai, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396 (1983) や Natoli, E. J. et al. Cancer Res. 46, 4166-4170(1986). GM3 に対しては Hirabayashi, Y. et al. J. Biol. Chem. 260, 13328-13333 (1985) のような研究がある。しかしながら現在までガングリオンドに対するモノクローナル抗体はそれほど数多く作られていないのが現状である。

これまで腫瘍細胞表面ガングリオンドに対するモノクローナル抗体が作られてこなかった大きな要因として、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るに際し、ヒト腫瘍細胞で感作させたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髓腫細胞を融合する異種免疫の方法を用いてきたことが挙げられる。即ち、抗原として投与される腫瘍細胞が

異種であるヒト由来のものであるため、ヒトの主要組織適合抗原系(Major Histocompatibility Complex)であるHLAを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマばかりが得られ、目的とするハイブリドーマを得る確率が非常に小さかった。

このような状況下で本発明者らは上記の方法に代えて、マウスリンパ系腫瘍細胞で感作されたマウスの抗体産生細胞とマウス骨髓腫細胞とを融合させる同種免疫の方法を採ることにより、HLAを認識するモノクローナル抗体を産生する不要なハイブリドーマの生成が排除され、マウスおよびヒトの腫瘍細胞の細胞表面の極端共通の腫瘍関連抗原であるガングリオンド、特に GD2 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを極めて効率良く得ることができることを発見した。そして本発明者らはこの発見に基づいて創製されるモノクローナル抗体とそれを産生するハイブリドーマに関する発明について先に特許出願した(PCT/JP87/00690)。

一方、モノクローナル抗体の抗原に対する強い特異性を利用して悪性腫瘍の治療に役立てようとする試みも精力的になされてきた。その結果ガングリオンドを抗原とするモノクローナル抗体が腫瘍の治療に有用であることが知られ始めた(Hakomori, S. Cancer Res. 45, 2405-2414(1985))。

そしてこのようなガングリオンドを抗原とするモノクローナル抗体の一部は既に臨床応用の段階にまで進んで来ている。例えば、Dippoldらがヒトメラノーマ細胞株SK-MEL28をマウスに免疫することにより作り出し(Dippold W. G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6114-6118(1980))、PukelらがGD3を認識することを示した(Pukel, C. S. et al. J. Exp. Med. 155, 1133-1147(1982))、抗GD3モノクローナル抗体R24を、Houghtonらが転移性腫瘍を持つメラノーマ患者12例に2週間にわたり約8回全身投与したところ、3例に顕著な腫瘍の縮小を認めた(Houghton, A. N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1242-1246 (1985))。R24については、これを使用してヒトの神経外胚

源性悪性腫瘍と上皮性ガンの治療する方法に関する発明が、特開昭62-289524として出願されている。また、Cheungがヒト神経芽細胞株LAN-1をマウスに免疫して得られた抗GD2モノクローナル抗体3F8を12例の転移性腫瘍患者(メラノーマ6例、神経芽細胞腫4例、骨肉腫2例)に全身投与して、3例に顕著な効果が認められたと報告している(Cheung, N. K. et al. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 27, 318(1986))。更にはIrieらはメラノーマ患者の末梢血リンパ球をEBウィルスで株化することにより得られた細胞が生産する抗GD2モノクローナル抗体L72を8人の患者の合計21箇所(転移性メラノーマに補体と共に投与したところ、16箇所)で退縮が認められ、このうち10箇所では完全に消滅したと報告している(Irie, R. F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8694-8698(1986))。

そして本発明者らは上に記した特許出願(PCT/JP87/00690)の実施例に記載したモノクローナル抗体の中の一つにそれ自身で強い抗腫瘍性を持つ

ものを見出し、用途発明(抗腫瘍剤)として特許出願を行なった(特願昭63-21317)。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者らの先の出願(特願昭63-21317)は、それまでのモノクローナル抗体を有効成分とする抗腫瘍剤の殆どがメラノーマに対する効果であり、一部が神経腫瘍を退縮させるものであって、適用範囲はごく限られたものであったのに対し、白血病の如き悪性リンパ腫のモノクローナル抗体による治療効果を見出した点に大きな意味がある。

しかしながら同一の名称で呼ばれる腫瘍であっても腫瘍の多様性は大きく、一つの抗腫瘍剤があるゆる症例に対して著効を示すとは限らず、又腫瘍自体が抗腫瘍剤の投与を継続するうちに薬剤に対して低抵抗性を示すようになる場合が多い。そのために、癌の治療に際して治療開始から完癒まで単一の抗腫瘍剤で事足りることは少なく、複数の薬剤が求められている。

工研にFEPH P-9993として寄託され、そして、モノクローナル抗体 A1.425 を産生するハイブリドーマA1.425は微工研にFEPH P-9994として寄託されている。

本発明の抗腫瘍剤を上記モノクローナル抗体を有効成分として製剤化するには公知の方法を適用すればよい。投与方法としては悪性リンパ腫の治療に用いる関係上、点滴注射による投与が好ましい。

注射薬の製剤には、生理的食塩水、滅菌水リンゲル液等の水溶性溶剤、非水性溶剤、等張化剤、無痛化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、懸濁化剤、緩衝剤、乳化剤等を任意に使用し得る。

一例として、生理的食塩水(塩濃度約0.9%)にヒト血清アルブミンを5%にモノクローナル抗体を適量含むものを調製して注射剤とする。

モノクローナル抗体は点滴注射製剤中0.1 μ g \sim 100mg/ml、好ましくは1 μ g \sim 1mg/ml含有される。

点滴投与量は症状、腫瘍の進行、年齢、性別等

(問題点を解決するための手段)

そこで本発明者らは更に絞って先に出願した方法と同じでハイブリドーマを創製して、ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のうち抗腫瘍効果のあるものを探索してきたところ、上述のモノクローナル抗体A1.267、A1.410及びA1.425が強い抗腫瘍効果を持つことを発見し、本発明を完成した。

即ち本発明者らはマウスT細胞白血病細胞株を移植されたマウスにモノクローナル抗体A1.267、A1.410又はA1.425を投与したところ、これらモノクローナル抗体がこの担癌マウスの寿命を著明に延長し、或は腫瘍を完全に拒絶させることを認めたのである。

本発明はモノクローナル抗体A1.267、A1.410又はA1.425を有効成分とする新規な抗腫瘍剤である。

そして、本発明に係るモノクローナル抗体 A1.267 を産生するハイブリドーマA1.267は微工研にFEPH P-9992として寄託され、モノクローナル抗体 A1.410 を産生するハイブリドーマA1.410は微

工研に 50 \sim 1,000mgであり、毎日或は適当に日をおいて与える。

以下に本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1(ハイブリドーマの作製)

C57BLマウス由来のT細胞腫瘍株EL4を 10^5 細胞/マウス、1回/週、4週間に亘りA系マウスの腹腔内に接種し、最終接種後3日目に脾臓を摘出してこれを常法により組織培養液RPMI1640(GIBCO社製)中の細胞遊離液として調製した。

一方融合の親細胞としてBalb/c系マウス由来の骨髓腫瘍細胞NS1を培養して 10^5 細胞用意した。

これらの細胞の融合は Koehler と Milstein の方法(Nature, 256, 495(1975))に従い、以下のように行なった。

前述のようにして調製した脾臓の遊離細胞と骨髓腫瘍細胞を細胞数で5:1となるように遠心チューブ内で混合し、500r.p.m.で5分遠心した後上清を捨て、RPMI1640で濃度40%(v/v)に調製したポリエチレングリコール(メルク社製;平均分子

量4,000)を0.2ml加えて2分間よく攪拌混合した。その後これに5mlのRPMI1640を1滴ずつ3分間かけて添加して希釈し、500r.p.m.で5分遠心した後に上清を捨てた。次いで細胞をHAT培地(RPMI1640培地に10%(v/v)ウシ胎児血清を加え、最終濃度でヒポキサンチン 10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-5} M、チミジン 1.5×10^{-5} Mを加えたもの)に浮遊させて100μl/穴の割合で96穴マイクロプレートに分注した。

温度37℃、CO₂:空気=5:95の気相でこれを培養し、培養3日目および6日目にHAT培養で培地交換を行なった。それ以後は3日毎にHT培地(HAT培地からアミノプテリンのみを除いた培地)で培地交換を行なった。

培養を続け、細胞のコロニーの形成が認められるようになった時点(約10~14日目)で培養上清中の抗体活性を測定してスクリーニングを行なった。スクリーニングはウサギ血清補体を併用する細胞凝集試験法を用いた。具体的には、標的となるC57BL/マウス由来のT細胞腫瘍株EL4の細胞浮遊液

(細胞濃度 5×10^4 個/ml)20μl、ウサギ血清補体20μlおよび培養上清20μlを混合して時々攪拌しつつ37℃で45分間反応させた。反応終了後氷冷してトリパンブルー水溶液50μlを加えた後、顕微鏡で観察してトリパンブルーを取り込んだ細胞の有無により培養上清の細胞障害活性を判断した。

スクリーニングを行なったハイブリドーマ486株のうち、細胞障害活性をもつ抗体を産生するものが14株得られ、そのうち1株のハイブリドーマについて、限界希釈法によりクローン化した。更にクローニングを繰り返して安定で単一の細胞由来のハイブリドーマA1.267を得た。

同様にして、ハイブリドーマA1.410を得た。

また、同様にして、ハイブリドーマA1.425を得た。

なお、オクタロニー法により各ハイブリドーマが産生する各モノクローナル抗体の免疫グロブリンのクラスを調べたところ、いずれも(IgG₂*)であった。

実施例2(モノクローナル抗体A1.267の精製)

Balb/c系のヌードマウスの腹腔にプリステン0.5ml投与し、7日後に実施例1により得られたハイブリドーマA1.267(FERN P-9992)約5~10×10⁴細胞を腹腔内接種して腹水化を行なった。1~2週間後に腹水を採取し、3,000r.p.m.、15分間の遠心により上清上層部分のプリステンと沈殿物である細胞塊を取り除いたモノクローナル抗体が含まれる中間層の部分を取り出した。

上記により回収された溶液10mlに硫酸アンモニウムを最終濃度50%となるように加えて、塩析した。これを10,000r.p.m.、30分間の遠心にかけ、沈澱した分画をPBS(pH7.2)の0.01M磷酸緩衝液に0.15M NaClを加えた磷酸緩衝液(透析液)10mlに溶かした。この溶液をPBS 1,000mlに対して3回透析を繰り返し、免疫グロブリン分画とした。

次いで該免疫グロブリン分画を、0.03M NaClを含むpH8.0の磷酸緩衝液に対して十分に透析した。別にこれと同じ緩衝液で平衡化しておいたイオン交換樹脂DE52カラム(ワットマン社製)に該透析液をかけ、DE52カラムに吸着されなかった分画を回

収した。この回収された分画をPBSに対して透析を行なったものを精製IgG抗体とし、モノクローナル抗体A1.267を得た。

実施例3(モノクローナル抗体A1.267の特異性)

モノクローナル抗体A1.267が認識しているガングリオシドを決定するために、薄層クロマトグラフィ(以下TLCと称す)上での酵素免疫染色法を行なった。

(1) ヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画、ガングリオシド純品および中性脂質純品の調製
ヒトメラノーマ細胞株UCLASO-M14(以下M14という)はカルホルニア大学のR.Irie博士より入手したもので、M14のガングリオシド分画の調製はTul, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)に従った。

ガングリオシドGM1, GD1a, GD1b, GT1bはウシの脳から調製し、Kanfer, J. N. Methods Enzymol. 14, 660-664(1969)に従って精製した。GD1bはヤマトン社から購入した。ヒト脳のGM3はスウェー

デンのGöteborg大学のL. Svennerholm博士から入手した。GM2とGD2はそれぞれGM2とGD1bから、ウシ赤丸β-ガラクトシダーゼ(アメリカのミシガン大学のJ. W. Jourdain博士から入手)を用いて調製した。ヒトミエリンのGM4とヒト脳のGT1aは東京都臨床医学総合研究所の有賀博士から入手した。クマ赤血球のGD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuAc, NeuGc), GD3(NeuGc, NeuAc), および GD3(NeuGc, NeuGc)は東京都臨床医学総合研究所の橋本博士と鈴木明身博士から入手した。LacCer, GgOs₂Cer, および GgOs₂CerはそれぞれGM3, GM2, GM1から弱酸で処理し、イアトロビーズカラムクロマトグラフィーで精製して調製した。GlcCerはTal, T, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5382-5386(1983)に従って調製した。GbOs₂CerとGbOs₂CerはSupelco社(アメリカ、ペンシルバニア州、ペラフォンテ)から購入した。

(2) の方法

メルク社製のシリカゲルを塗布済みの TLCプレート「シリカゲル60」(厚さ200 μm)と同じくメル

ク社製のシリカゲルを塗布済みの TLCプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの展開溶媒はクロロフォルム/メタノール/0.22% CaCl₂水溶液を容積比55/45/10としたものを用いた。なお、TLCプレート上に展開されたガングリオシドを染色する場合にはレゾルシノール(resorcinol)染色を、中性脂質の染色にはオルシノール(orcinol)染色を用いた。

(3) TLCプレート上でのモノクローナル抗体 A1.267による酵素免疫染色法

ガングリオシドのTLC終了後、TLCプレートを用意した。シリカゲルを塗布済みの TLCプレート(シリカゲル60)1%と含有する硝酸緩衝液に浸した。空気中で乾燥させた後、プレートをモノクローナル抗体A1.267溶液(10 μg/ml)と2時間25℃で反応させた。次に硝酸緩衝液(以下PBSと称す)を5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。そして西洋ワサビペロキシダーゼを結合させたヤギ抗マウスIgGおよびIgM抗体をこのクロマトグラムと25℃で2時間反応

させた。再び PBSを5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。染色に当たっては 400 μg/mlのO-フェニレンジアミンと0.12%の過酸化水素を含むクエン酸-磷酸緩衝液(pH5.0, 80mM)を用い、15分間反応させて、発色させた。その後水に浸して反応を停止させた。

(4) ガングリオシド純品混合物及び M14 のガングリオシドのモノクローナル抗体A1.267と反応させた TLCプレート上での酵素免疫染色法の結果

第1図は左のレーンから、ガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)をTLCにかけてレゾルシノールで染色したもの、ヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画をTCLにかけてレゾルシノールで染色したもの、M14のガングリオシド分画をTCLにかけた後A1.267で酵素免疫染色を行ったものである。(レーン番号3)

この図のレーン番号3で示されるように、モノクローナル抗体A1.267はガングリオシドGD2とGD3とに反応している。

その他のガングリオシド純品および中性脂質

純品についても各々TCLにかけた後モノクローナル抗体A1.267で酵素免疫染色を行った。これらの結果については図には示さず、第1図の内容と合わせて、A1.267との反応性を表1に示す。

表 1

ガングリオシド	反応性	ガングリオシド	反応性
GD3	++	GM3	-
GD2	+++	GM2	-
GD1a	-	GM1	-
GD1b	++	GlcCer	-
GT1a	++	LacCer	-
GT1b	+	GgO ₆ Cer	-
GQ1b	++	GcO ₆ Cer	-
GT3	-	GbO ₆ Cer	-
GT2	-	GbO ₆ Cer	-
GM4	-		

+++：強い、++：中程度、

+：弱い、若しくは痕跡程度、-：陰性

表1から分かるように本発明のモノクローナル抗体はモノシロシロル-ガングリオシド (GM4、GM3、GM2およびGM1)、および中性糖脂質 (GlcCer、LacCer、GgO₆Cer、GcO₆Cer、GbO₆CerおよびGbO₆Cer) とは反応しない。

即ち、A1.267 は NeuAc α 2 → 8 NeuAc α 2 → 3 Gal と

(NeuAc, NeuGc)、GD3 (NeuGc, NeuAc)、および GD3 (NeuGc, NeuGc)) とモノクローナル抗体のTLCプレート上で酵素免疫染色法の結果は第2回に示されている。

第2回(A)は4種類のGD3をTLCにかけ、レゾルシノールで染色したものである。左からガングリオシド純品の混合物 (GM3+GM1+GD3)、レーン番号1はGD3 (NeuAc, NeuAc)、レーン番号2はGD3 (NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3 (NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3 (NeuGc, NeuGc) である。第2回(D)はA1.267によるTLCの酵素免疫染色の結果である。レーン番号とGD3の種類は第2回(A)と同じである。

A1.267が反応したのはGD3 (NeuAc, NeuAc) と GD3 (NeuGc, NeuAc) である。この結果はA1.267のガングリオシドの認識には三糖の内部シアル酸が必須であり、かつ該シアル酸は NeuAc 残基でなければならないことを示している。内部シアル酸が NeuAc でなく、NeuGc の時は認識されていない。一方、末端シアル酸残基は NeuGc、NeuAc のいずれで

いう三糖構造を持つGD3、GD2、GD1b、GT1a、GT1b および GQ1b と反応し、他のガングリオシドとは反応しない。最も強く反応するのが GD2 であり逆に最も反応が弱いのは GT1b である。GD2 にガラクトース1個が付加された GD1b は反応性が弱くなり、GD1b に更にシアル酸が末端ガラクトース残基に付加された GT1b はもっと反応性が落ちる。この知見からシアル酸が末端のガラクトース残基 (GD1b) や末端のシアン酸残基 (GT1b) に付加することによって、抗原決定基である NeuAc α 2 → 8 NeuAc α 2 → 3 Gal はマスクされることが示唆される。一方、GT1b の末端シアル酸残基にシアル酸が付加した GQ1b は GD1d のレベルまで反応性が回復する。GT1a は反応性は GQ1b と同程度であるから、GQ1b の認識部位は末端の三糖であるはずである。以上から、A1.267 はガラクトース残基 (場所は内部、末端を問わない) に結合したジシロル残基「NeuAc α 2 → 8 NeuAc α 2 → 3」を認識していることが判明した。

次に4種類の GD3 (GD3 (NeuAc, NeuAc)、GD3

も A1.267 に認識されている。すると、A1.267 の抗原決定基は Sia α 2 → 8 NeuAc α 2 → 3 Gal 残基となるはずである。

以上の結果をまとめると、モノクローナル抗体 A1.267 の細胞表面ガングリオシドに対する認識の特異性は、

GD2>GD3 (NeuAc, NeuAc), GD3 (NeuGc, NeuAc), GD1b, GT1a, GQ1b>GT1

であると考えられる。

この特異性のパターンは本発明者が先に出願した PCT/JF87/00690 の実施例に記載のモノクローナル抗体 No.2 と全く同じである。但し No.2 は免疫グロブリンのクラスが (IgM, x) であって、A1.267 のクラス (IgG, x) とは異なっている。

実施例4(モノクローナル抗体A1.410の精製)

Ba1b/c系のスードマウスの腹腔にプリステン0.5mg投与し、7日後に実施例1により得られたハイブリドーマA1.410(FERM P-9993)約5~10×10⁶細胞を腹腔内接種して腹水化を行なった。1~2週間後に腹水を採取し、3,000r.p.m.、15分間の遠心により上清上層部分のプリステンと沈澱物である細胞塊を取り除いたモノクローナル抗体が含まれる中間層の部分回収した。

上記により回収された溶液10mlに硫酸アンモニウムを最終濃度50%となるように加えて、塩析した。これを10,000r.p.m.、30分間の遠心にかけ、沈澱した分画をPBS(pH7.2の0.01M磷酸緩衝液に0.15M NaClを加えた磷酸緩衝液)10mlに溶かした。この溶液をPBS 1,000mlに対して3回透析を繰り返し、免疫グロブリン分画とした。

次いで該免疫グロブリン分画を、0.03M NaClを含むpH8.0の磷酸緩衝液に対して十分に透析した。別にこれと同じ緩衝液で平衡化しておいたイオン交換樹脂DE52カラム(ワットマン社製)に該透析液

をかけ、DE52カラムに吸着されなかった画分を回収した。この回収された画分をPBSに対して透析を行なったものを粗製IgG抗体とし、モノクローナル抗体をA1.410を得た。

実施例5(モノクローナル抗体A1.410の特性)

モノクローナル抗体A1.410が認識しているガングリオシドを決定するために、薄層クロマトグラフィ(以下TLCと称す)上での酵素免疫染色法を行なった。

(1) ヒトメラノーマ株M14のガングリオシド分画と糖脂質純品の調製

M14のガングリオシド分画の調製はTai, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)に従った。

グリグリオシドGM1, GD1a, GD1b, GT1bはウシの脳から調製し、Kanfer, J. W. Methods Enzymol. 14, 660-664(1969)に従って精製した。GQ1bはヤマトン社から購入した。ヒト脳のGM3はスウェーデンのGöteborg大学のL. Svennerholm博士から入手した。GM2とGD2はそれぞれGM2とGD1bから、ウ

シ乳梨β-ガラクトシダーゼ(アメリカのミシガン大学のJ. V. Jourdain博士から入手)を用いて調製した。ヒトミエリンのGM4とヒト脳のGT1aは東京都臨床医学総合研究所の有賀博士から入手した。クマ赤血球のGD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuAc, NeuGc), GD3(NeuGc, NeuAc)、およびGD3(NeuGc, NeuGc)は東京都臨床医学総合研究所の橋本博士と鈴木明身博士から入手した。LacCer, GbOs₂Cer, およびGbOs₂CerはそれぞれGM3, GM2, GM1から弱酸で処理し、イアトロビーズカラムクロマトグラフィで精製して調製した。GlcCerはTai, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)に従って調製した。GbOs₂CerとGbOs₂CerはSupelco社(アメリカ、ペンシルバニア州、ベラフォンテ)から購入した。

(2) TLCの方法

メルク社製のシリカゲルを塗布済みのTLCプレート「シリカゲル60」(厚さ200μm)と同じくメルク社製のシリカゲルを塗布済みのTLCプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの展開溶媒

はクロロフォルム/メタノール/0.22% CaCl₂水溶液を容積比55/45/10としたものを用いた。TLCプレート上に展開されたガングリオシドの染色にはレゾルシノール(resorcinol)染色を、中性糖脂質の染色にはオルシノール(orcinol)染色を用いた。

(3) TLCプレート上での酵素免疫染色法

ガングリオシドのTLC終了後、TLCプレートをウシ血清アルブミン1%とポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone)1%とを含有する磷酸緩衝液に浸した。空气中で乾燥させた後、プレートをモノクローナル抗体溶液(10μg/ml)と2時間25℃で反応させた。次に磷酸緩衝液(以下PBSと称す)を5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。そして西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウスIgGおよびIgM抗体をこのクロマトグラムと25℃で2時間反応させた。再びPBSを5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。染色に当たっては400μg/mlの0-フェニレンジアミンと0.12%の過酸化水素を含む

クエン酸-磷酸緩衝液(pH5.0、80mM)を用い、15分間反応させた。その後、水に浸して反応を停止させた。

(4) M14 のガングリオシドのモノクローナル抗体とを反応させた TLCプレート上での酵素免疫染色法の結果

第1図は左のレーンから、ガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)をTLCにかけてレゾルシノールで染色したもの、ヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画をTCLにかけてレゾルシノールで染色したもの、M14のガングリオシド分画をTCLにかけた後A1.410で酵素免疫染色を行ったものである。(レーン番号5)

この図のレーン番号5で示されるように、モノクローナル抗体A1.410はG02にのみ反応している。その他のガングリオシド純品および中性糖脂質純品についても各々TCLにかけた後モノクローナル抗体A1.410で酵素免疫染色を行った。これらの結果については図には示さず、第1図の内容と合わせて、A1.410との反応性を表2に示す。

(NeuAc, NeuGc), G03(NeuGc, NeuAc)、およびGD3(NeuGc, NeuGc))とモノクローナル抗体A1.410のTLCプレート上で酵素免疫染色法の結果は第2図の(C)に示されている。A1.410はこれらの何れとも反応しなかった。

以上のように、少なくとも反応性試験を行なったガングリオシドの範囲内ではモノクローナル抗体A1.410は細胞表面ガングリオシドに対してはG02とのみ反応した。

表 2

ガングリオシド	反応性	ガングリオシド	反応性
G03	—	GM3	—
GD2	+++	GM2	—
G01a	—	GM1	—
GD1b	—	GlcCer	—
GT1a	—	LacCer	—
GT1b	—	Gg0s ₃ Cer	—
GQ1b	—	Gg0s ₄ Cer	—
GT3	—	Gb0s ₃ Cer	—
GT2	—	Gb0s ₄ Cer	—
GM4	—		

+++：強い、++：中程度、
+：弱い、若しくは痕跡程度、—：陰性

表2から分かるように本発明のモノクローナル抗体A1.410はモノシアロシルーガングリオシド(GM4, GM3, GM2およびGM1)、および中性糖脂質(GlcCer, LacCer, Gg0s₃Cer, Gg0s₄Cer, Gb0s₃CerおよびGb0s₄Cer)とは反応しない。

次に4種類のGD3(G03(NeuAc, NeuAc), GD3

実施例6(モノクローナル抗体A1.425の精製)

Balb/c系のヌードマウスの腹腔にプリステン0.5ml投与し、7日後に実施例1により得られたハイブリドーマA1.425(FERN P-9994)約5~10×10⁶細胞を腹腔内接種して腹水化を行なった。1~2週間後に腹水を採取し、3,000r.p.m.、15分間の遠心により上清上層部分のプリステンと沈殿物である細胞塊を取り除いたモノクローナル抗体が含まれる中間層部分を回収した。

上記により回収された溶液10mlに硫酸アンモニウムを最終濃度50%となるように加えて、塩析した。これを10,000r.p.m.、30分間の遠心にかけて、沈殿した分画をPBS(pH7.2の0.01M磷酸緩衝液に0.15M NaClを加えた磷酸緩衝液)10mlに溶かした。この溶液をPBS 1,000mlに対して3回透析を繰り返して、免疫グロブリン分画とした。

次いで該免疫グロブリン分画を、0.02M NaClを含むpH8.0の磷酸緩衝液に対して十分に透析した。別にこれと同じ緩衝液で平衡化しておいたイオン交換樹脂DE52カラム(ワットマン社製)に該透析液

をかけ、DE52カラムに吸着されなかった画分を回収した。この回収された画分をPBSに対して透析を行なったものを精製 IgG抗体とし、モノクローナル抗体 A1.425を得た。

実施例7(モノクローナル抗体A1.425の特異性)

モノクローナル抗体A1.425が認識しているガングリオシドを決定するために、薄層クロマトグラフィー(以下TLCと称す)上での酵素免疫染色法を行なった。

(1) ヒトメラノーマ株M14のガングリオシド分画と脂質純品の調製

M14のガングリオシド分画の調製はTai, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396 (1983)に従った。

ガリグリオシドGM1, GD1a, GD1b, GT1b はウシの脳から調製し、Kanfer, J. N. Methods Enzymol. 14, 660-664(1969)に従って精製した。GD1bはヤマトロン社から購入した。ヒト脳の GM3はスウェーデンのGöteborg大学のL. Svennerholm博士から入手した。GM2とGD2はそれぞれGM2とGD1bから、ウ

シ毒丸β-ガラクトシダーゼ(アメリカのミシガン大学のJ. W. Jourdan博士から入手)を用いて調製した。ヒトミエリンのGM4とヒト脳のGT1aは東京都臨床医学総合研究所の有賀博士から入手した。クマ赤血球のGD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuAc, NeuGc), GD3(NeuGc, NeuAc), および GD3(NeuGc, NeuGc)は東京都臨床医学総合研究所の橋本博士と鈴木明身博士から入手した。LacCer, GgOs, Cer, および GgOs, CerはそれぞれGM3, GM2, GM1から弱酸で処理し、イアトロビーズカラムクロマトグラフィーで精製して調製した。GlcCerはTai, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5396(1983)に従って調製した。GbOs, CerとGbOs, CerはSupelco社(アメリカ、ペンシルバニア州、ペラフォンテ)から購入した。

(2) TLCの方法

メルク社製のシリカゲルを塩布済みの TLCプレート「シリカゲル60」(厚さ200μm)と同じくメルク社製のシリカゲルを塩布済みの TLCプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの展開溶媒

はクロロホルム/メタノール/0.22% CaCl₂水溶液を容積比55/45/10としたものを用いた。TLCプレート上に展開されたガングリオシドの染色にはレゾルシノール(resorcinol)染色を、中性脂質の染色にはオルシノール(orcinol)染色を用いた。

(3) TLCプレート上での酵素免疫染色法

ガングリオシドのTLC精製後、TLCプレートをウシ血清アルブミン1%とポリビニルピロリドン(polyvinylpyrrolidone)1%とを含有する磷酸緩衝液に浸した。空気中で乾燥させた後、プレートをモノクローナル抗体溶液(10μg/ml)と2時間25℃で反応させた。次に磷酸緩衝液(以下PBSと称す)を5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。そして西洋ワサビペルオキシダーゼを結合させたヤギ抗マウスIgGおよびIgM抗体をこのクロマトグラムと25℃で2時間反応させた。再びPBSを5回交換しつつその中でクロマトグラムを洗浄した。染色に当たっては400μg/mlの0-フェニレンジアミンと0.12%の過酸化水素を含む

クエン酸-磷酸緩衝液(pH5.0, 80mM)を用い、15分間反応させた。その後、水に浸して反応を停止させた。

(4) M14のガングリオシドのモノクローナル抗体とを反応させたTLCプレート上での酵素免疫染色法の結果

第1図は左のレーンから、ガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)をTLCにかけてレゾルシノールで染色したもの、ヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画をTCLにかけてレゾルシノールで染色したもの、M14のガングリオシド分画をTCLにかけた後A1.425で酵素免疫染色を行なったものである。(レーン番号6)

この図のレーン番号6で示されるように、モノクローナル抗体A1.425はGD2にのみ反応している。

その他のガングリオシド純品および中性脂質純品についても各々TCLにかけた後モノクローナル抗体A1.425で酵素免疫染色を行なった。これらの結果については図には示さず、第1図の内容と合わせて、A1.425との反応性を表3に示す。

表 3

ガングリオシド	反応性	ガングリオシド	反応性
GD3	—	GM3	—
GD2	+++	GM2	—
GD1a	—	GM1	—
GD1b	—	GlcCer	—
GT1a	—	LacCer	—
GT1b	—	Gg0s ₃ Cer	—
GQ1b	—	Gg0s ₄ Cer	—
GT3	—	Gb0s ₃ Cer	—
GT2	—	Gb0s ₄ Cer	—
GM4	—		

+++：強い、++：中程度

+：弱い、若しくは痕跡程度、—：陰性

表3から分かるように本発明のモノクローナル抗体A1.425はモノシアロシル-ガングリオシド(GM4、GM3、GM2およびGM1)、および中性糖脂質(GlcCer、LacCer、Gg0s₃Cer、Gg0s₄Cer、Gb0s₃CerおよびGb0s₄Cer)とは反応しない。

次に4種類のGD3(GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3

(NeuAc, NeuGc)、GD3(NeuGc, NeuAc)、およびGD3(NeuGc, NeuGc))とモノクローナル抗体A1.425のTLCプレート上で酵素免疫染色法の結果は第2図(C)に示されている。

第2図(A)は4種類のGD3をTLCにかけ、レゾルシノールで染色したものである。左からガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD1)、レーン番号1はGD3(NeuAc, NeuAc)、レーン番号2はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3(NeuGc, NeuGc)である。第2図(C)はA1.425によるTLCの酵素免疫染色の結果である。レーン番号とGD3の種類は第2図(A)と同じである。この図の(C)から判るように、A1.425はこれらの何れとも反応しなかった。

以上のように、少なくとも反応性試験を行なったガングリオシドの範囲内ではモノクローナル抗体A1.425は細胞表面ガングリオシドに対してはGD2とのみ反応した。

表 4

モノクローナル抗体A1.267の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果
(接種細胞数 2×10^4)

群	投与量 (μ g)	MSD (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.0	0	0/14
投与群	100	>60.0	>172.7	3/5
	500	50.5	129.5	2/5

実施例9 (モノクローナル抗体A1.267の抗腫瘍効果その2)

対照群の動物数を9匹、接種細胞数を 1×10^4 個、接種方法を皮下移植、モノクローナル抗体の投与量を500 μ gだけとした他は実施例8と同じ条件で実験を行なった。

結果を表5に示す。抗腫瘍効果の判定は実施例8と同じ値を使用した。

第4図は第3図と同様に対照群とA1.267を500 μ g投与群について、腫瘍細胞移植後の日数経過に対して生存しているマウスの割合をグラフに示す。

実施例8 (モノクローナル抗体A1.267の抗腫瘍効果その1)

実験動物としてはC57BL/6マウスを対照群は14匹、試験群はモノクローナル抗体の投与量により2群に分け、各々5匹を使用した。移植腫瘍にはC57/BL6と同系(syngeneic)のT細胞白血病細胞株EL4を使用し、 2×10^4 個腹腔内に接種した。翌日腫瘍接種腹腔液0.2mlに溶かした100 μ g又は500 μ gのモノクローナル抗体A1.267を試験群に、対照群には同量の腫瘍接種腹腔液のみを腹腔内に投与し、マウスの生死を60日間観察した。

結果を表4に示す。なお、抗腫瘍効果の判定にはMSD(Median Survival Day; 生存日数中央値)とILS(Increased Life Span=(T-C)/C; 延命率)を用いた。

また第3図には対称群とA1.267を500 μ g投与群について、腫瘍細胞移植後の日数経過に対して生存しているマウスの割合をグラフに示す。

したものである。

表 5

モノクローナル抗体A1.267の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果
(接種細胞数 1×10^6)

群	投与量 (μ g)	M S D (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.5	0	0/9
投与群	500	>60	>166.7	4/5

実施例8および実施例9の結果から判るように、モノクローナル抗体A1.267の投与によりマウスT細胞白血病の増殖は著しく抑制され、或は移植腫瘍は拒絶されるに至ったことが示された。

実施例10 (モノクローナル抗体A1.410の抗腫瘍効果その1)

実験動物としては C57BL/6マウスを対照群は14匹、試験群はモノクローナル抗体の投与量により2群に分け、各々5匹使用した。移植腫瘍には C57/BL.6と同系(syngeneic)のT細胞白血病細胞株

表 6

モノクローナル抗体A1.410の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果
(接種細胞数 2×10^4)

群	投与量 (μ g)	M S D (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.0	0	0/14
投与群	100	>60.0	>181.7	4/5
	500	30.5	43.2	2/5

実施例11 (モノクローナル抗体A1.410の抗腫瘍効果その2)

対照群の動物数を9匹、接種細胞数を 1×10^6 個、接種方法を皮下移植、モノクローナル抗体の投与量を 500μ g だけとした他は実施例10と同じ条件で実験を行なった。

結果を表7に示す。抗腫瘍効果の判定は実施例10と同じ値を使用した。

第5図は第5図と同様に対照群とA1.410を 500μ g 投与群について、腫瘍細胞移植後の日数経過に対して生存しているマウスの割合をグラフに示

EL4を使用し、 2×10^6 個細胞内に接種した。翌日磷酸緩衝塩酸液 0.2 ml に溶かした 100μ g 又は 500μ g のモノクローナル抗体A1.410を試験群に、対照群には同量の磷酸緩衝塩酸液のみを腹腔内に投与し、マウスの生死を60日間観察した。

結果を表6に示す。なお、抗腫瘍効果の判定にはMSD(Median Survival Day; 生存日数中央値)とILS(Increased Life Span=(T-C)/C; 延命率)を用いた。

また第5図には対照群とA1.410を 500μ g 投与群について、腫瘍細胞移植後の日数経過に対して生存しているマウスの割合をグラフに示す。

したものである。

表 7

モノクローナル抗体A1.410の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果
(接種細胞数 1×10^4)

群	投与量 (μ g)	M S D (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.5	0	0/9
投与群	500	60.5	62.2	1/5

実施例12 (モノクローナル抗体A1.410の抗腫瘍効果その3)

対照群の動物数を8匹、接種細胞数を 1×10^6 個、接種方法を皮下移植とし、モノクローナル抗体の投与方法を静脈投与(iv)と腹腔内投与(ip)の両方で行なった。他は実施例10と同じ条件で実験を行なった。

結果を表8に示す。抗腫瘍効果の判定は実施例10と同じ値を使用した。

表 8

モノクローナル抗体A1.410の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果

(接種細胞数 1×10^4)

群	投与量 (μ g)	MSD (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.3	0	0/8
	20	26.5	18.8	0/5
iv投与	100	31.5	41.3	0/5
	500	44.5	99.6	2/5
	20	25.5	14.3	0/5
ip投与	100	37.5	68.2	0/5
	500	39.5	77.1	2/5

実施例10、実施例11および実施例12の結果から判るように、モノクローナル抗体A1.410の投与によりマウスT細胞白血病の増殖は著しく抑制され、或は移植腫瘍は拒絶されるに至ったこと

表 9

モノクローナル抗体A1.425の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果

(接種細胞数 2×10^4)

群	投与量 (μ g)	MSD (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.0	0	0/14
	100	24.5	11.4	1/5
iv投与群	500	>60.0	>172.7	3/5

実施例14 (モノクローナル抗体A1.425の抗腫瘍効果その2)

対照群の動物数を9匹、接種細胞数を 1×10^5 個、接種方法を皮下移植。モノクローナル抗体の投与量を 500μ g だけとした他は実施例3と同じ条件で実験を行なった。

結果を表10に示す。抗腫瘍効果の判定は実施例13と同じ値を使用した。

第8図は第7図と同様に対照群とA1.425を 500μ g 投与群について、腫瘍細胞移植後の日数経過に対して生存しているマウスの割合をグラフに示

が示された。

実施例13 (モノクローナル抗体A1.425の抗腫瘍効果その1)

実験動物としては C57BL/6マウスを対照群は14匹、試験群はモノクローナル抗体の投与量により2群に分け、各々5匹使用した。移植腫瘍には C57/BL6 と同系 (syngeneic) の T細胞白血病細胞株 EL4 を使用し、 2×10^4 個数腔内に接種した。翌日磷酸緩衝塩類液 0.2 ml に溶かした 100μ g または 500μ g のモノクローナル抗体A1.425 を試験群に、対照群には同量の磷酸緩衝塩類液のみを腹腔内に投与し、マウスの生死を60日間観察した。

結果を表9に示す。なお、抗腫瘍効果の判定には MSD (Median Survival Day; 生存日数中央値) と ILS (Increased Life Span = (T-C)/C; 延命率) を用いた。

また第7図には対照群とA1.425を 500μ g 投与群について、腫瘍細胞移植後の日数経過に対して生存しているマウスの割合をグラフに示す。

したものである。

表 10

モノクローナル抗体A1.425の
T細胞白血病EL4に対する抗腫瘍効果

(接種細胞数 1×10^5)

群	投与量 (μ g)	MSD (日)	I L S (%)	60日間 生存数
対照群	0	22.5	0	0/9
投与群	500	39.5	75.6	1/5

実施例13、および実施例14の結果から判るように、モノクローナル抗体A1.425の投与によりマウスT細胞白血病の増殖は著しく抑制され、或は移植腫瘍は拒絶されるに至ったことが示された。

4. 図面の簡単な説明

第1図は左のレーンから、ガングリオシド純品の混合物 (GN3+GN2+GN1+GN3+GN2) を TLC にかけてレンジルシノールで染色したもの、ヒトメラノーマ細胞株 N14 のガングリオシド分画を TLC にかけてレンジルシノールで染色したもの、N14 のガングリオシ

ド分画をTLCにかけた後 A1.267、A1.410及びA1.425で酵素免疫染色を行なったものである。

第2図(A)は4種類のGD3をTLCにかけ、レゾルシンノールで染色したものである。左からガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)、レーン番号1はGD3(NeuAc, NeuAc)、レーン番号2はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3(NeuGc, NeuGc)である。第2図はA1.267、A1.410及びA1.425によるTLCの酵素免疫染色の結果である。レーン番号とGD3の種類は共通である。

第3図、第5図及び第7図には、C57/BL6マウスを用い、移植腫瘍としてこれと同系(syngeneic)のT細胞白血病細胞株EL4を使用し、 2×10^4 個の腹腔内に接種したものに対して、対照群とA1.267、A1.410及びA1.425をそれぞれ500 μ g投与した群について、腫瘍細胞移植後の日数経過と生存マウスの数の関係をグラフに示す。

第4図、第6図及び第8図は、接種細胞数を 1×10^4 個、接種方法を皮下移植とした他は第3図

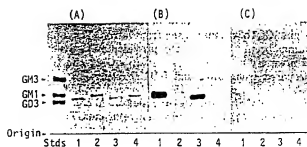
と同じ条件で実験を行ない、対照群とA1.267、A1.410及びA1.425をそれぞれ500 μ g投与した群について、腫瘍細胞移植後の日数経過と生存マウスの数の関係をグラフに示したものである。

代理人 弁理士 戸田 親 男

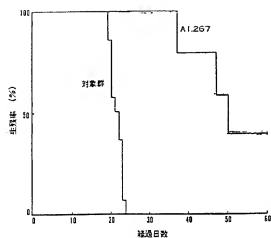
※1図



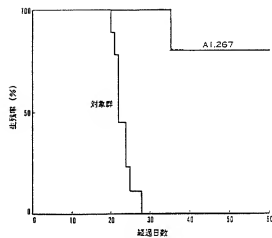
※2図



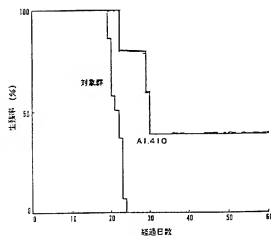
第 3 図



第 4 図



第 5 図



第 6 図

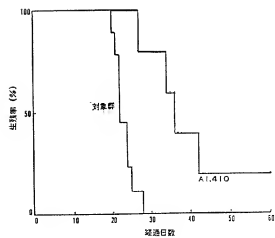


図7

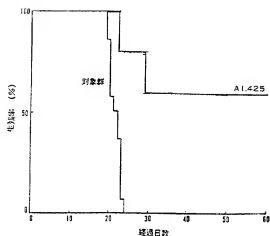
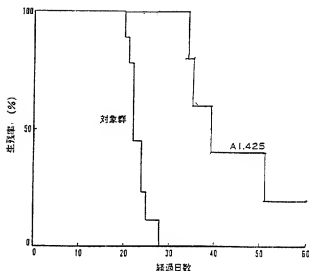


図8



手続補正書 (自発)

昭和63年 8月18日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

特和63年特許願第95724号

2. 発明の名称

抗腫瘍剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋2丁目3番6号

名称 (613) 明治乳業株式会社

代表者 島村 靖三

4. 代理人

住所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目18番14号

邦楽ビル503

氏名 弁理士(7577) 戸田 親 男

電話 508-0333

5. 補正により増加する発明の数

なし

6. 補正の対象

明細書

7. 補正の内容

(1) 明細書21頁10~16行を次のとおり補正する。

『第1図は ganglioside 純品の混合物 (GM3+GM2+GM1+GD3+GD2) 及びヒトメラノーマ細胞株M14の ganglioside 分離を TLC にかけての、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全ての ganglioside が染色されるため、TLC上の ganglioside の位置が示されている図で、レーン名Stdsは ganglioside 純品の混合物 (GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)、レーン名M14はヒトメラノーマ細胞株M14の ganglioside 分離である。(B)はヒトメラノーマ細胞株M14の ganglioside 分離の TLC を様々なモノクローナル抗体により酵素免疫染色法で染色した図である。これらのうちレーン番号3がA1.267による酵素免疫染色の結果である。なお、左の GM3、GM2、GM1、GD3及びGD2はそ



れぞれTLC上の位置を示している。』

(2) 明細書25頁5～13行を次のとおりに補正する。

『第2図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)、レーン番号1はGD3(NeuAc, NeuAc)、レーン番号2はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3(NeuGc, NeuGc)である。(B)がTLCをA1.267により酵素免疫染色した結果を示す図である。レーン番号とGD3の種類は(A)と同じである。また、左のGM3、GM1及びGD3はそれぞれのTLC上の位置を示している。』

(3) 明細書31頁7～13行を次のとおりに補正する。

(NeuGc, NeuGc))とモノクローナル抗体のTLCプレート上で酵素免疫染色法の結果は第2図に示されている。

第2図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)、レーン番号1はGD3(NeuAc, NeuAc)、レーン番号2はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3(NeuGc, NeuGc)である。(C)がTLCをA1.410により酵素免疫染色した結果を示す図である。レーン番号とGD3の種類は(A)と同じである。また、左のGM3、GM1及びGD3はそれぞれのTLC上の位置を示している。この図の(C)から判るように、A1.410はこれらのGD3の何れとも反応しなかった。』

(5) 明細書38頁7～13行を次のとおりに補正す

『第1図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画をTLCにかけたのち、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)、レーン名M14はヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画である。(B)はヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画のTLCを様々なモノクローナル抗体により酵素免疫染色法で染色した図である。これらのうちレーン番号5がA1.410による酵素免疫染色の結果である。なお、左のGM3、GM2、GM1、GD3及びGD2はそれぞれTLC上の位置を示している。』

(4) 明細書32頁最下行から33頁5行までを次のとおりに補正する。

『次に4種類のGD3 (GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3(NeuAc, NeuGc)、GD3(NeuGc, NeuAc)、およびGD3

る。

『第1図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画をTLCにかけたのち、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)、レーン名M14はヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画のTLCを様々なモノクローナル抗体により酵素免疫染色法で染色した図である。これらのうちレーン番号6がA1.425による酵素免疫染色の結果である。なお、左のGM3、GM2、GM1、GD3及びGD2はそれぞれTLC上の位置を示している。』

(6) 明細書40頁5～14行を次のとおりに補正する。

『第2図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1

+GD3) 及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)。レーン番号1はGD3(NeuAc, NeuAc)、レーン番号2はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3(NeuGc, NeuGc)である。(C)がTLCをA1.425により酵素免疫染色した結果を示す図である、レーン番号とGD3の種類は(A)と同じである。また、左のGM3、GM1及びGD3はそれぞれTLC上の位置を示している。この図の(C)から判るように、A1.425はこれらのGD3は何れとも反応しなかった。』

(7) 明細書50頁下から5行から51頁2行までを次のとおり補正する。

『第1図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画をTLCにかけたのち、レゾルシ

ノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM2+GM1+GD3+GD2)。レーン番号1はヒトメラノーマ細胞株M14のガングリオシド分画のTLCを様々なモノクローナル抗体により酵素免疫染色法で染色した図である。これらのうちレーン番号3がA1.267、レーン番号5がA1.410、レーン番号6がA1.425による酵素免疫染色法の結果である。また、左のGM3、GM2、GM1、GD3及びGD2はそれぞれTLC上の位置を示している。』

手続補正書(方式)

10 28
昭和63年 8月15日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

特和63年特許願第95724号

2. 発明の名称

抗腫瘍剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区京橋2丁目3番6号

名 称 (613) 明治乳業株式会社

代表者 島 村 靖 三

4. 代理人

住 所 〒105東京都港区虎ノ門一丁目19番14号

氏 名 邦楽ビル503 戸 田 親 男

電話 508-0333

5. 補正命令の日付

発送日 昭和63年7月20日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象 明細書の図面

8. 補正の内容

(1) 明細書51頁3～11行までを次の文に補正する。

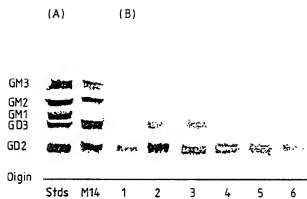
『第2図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオシドが染色されるため、TLC上のガングリオシドの位置が示されている図で、レーン名Stdはガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1+GD3)。レーン番号1はGD3(NeuAc, NeuAc)レーン番号2はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3(NeuGc, NeuGc)である。(B)はTLCをA1.267により酵素免疫染色した結果を示す図である。レーン番号とGD3の種類は(A)と同じである。(C)はモノクローナル抗体A1.410及びA1.425によりTLCを酵素免疫染色した結果を示す図である。レーン番号とGD3の種類は(A)と同じである。また、左の



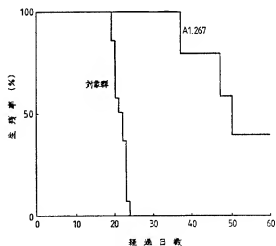
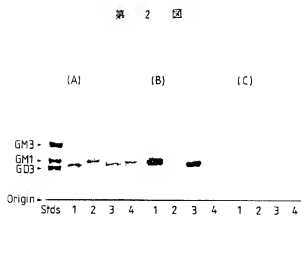
GM3、GM1及び GD3はそれぞれのTLCの位置を示している。』

(2) 油1〜8図も別紙のとおり添付する。

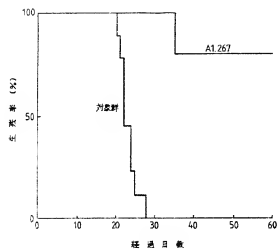
第 1 図



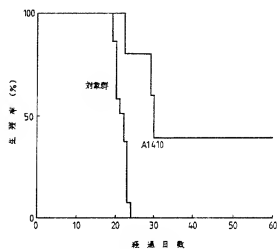
第 3 図



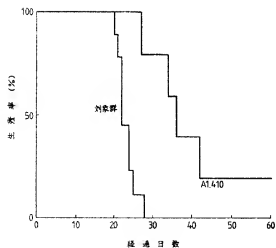
第 4 図



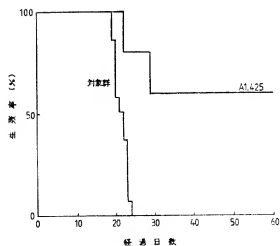
第 5 図



第 6 図



第 7 図



第 8 図

